

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-062220

(43)Date of publication of application : 08.03.1996

(51)Int.Cl.

G01N 33/66  
G01N 33/533

(21)Application number : 06-202185

(71)Applicant : KONICA CORP

(22)Date of filing : 26.08.1994

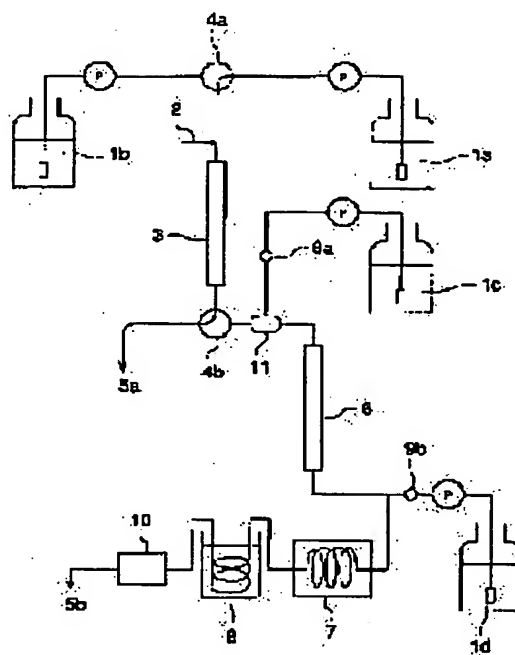
(72)Inventor : MURAKAMI TAKASHI

**(54) HIGHLY SENSITIVE MEASURING METHOD AND APPARATUS FOR SUGAR AND POLYOLS****(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To enable a highly sensitive measurement of sugar and polyols without any complicated concentrating operation by a method wherein the sugar and polyols separated are caused to react a reagent to convert them into fluorescent substances and the fluorescent substances generated are measured.

**CONSTITUTION:** Firstly, a column 3 for concentrating is washed and a sample from which protein is removed, is forced therinto through a sample forcing port 2. An adsorption liquid is continued to flow for a while and interfering substances other than sugar and polyols are discharged from a 5a. Then, a changeover valve 4a is turned to the eluant side to let eluants flow to the column 3 for concentration. Sugar and polyols eluted are fed to a mixer 11 via a valve 4b. Sugar and polyols mixed with an eluate within the mixer 11 and sent to an anion exchange column 6. The solution of the sugar and polyols sent is mixed with a reaction liquid by a pressure pump P and made to flow to a reaction pipe set

on a reaction tank 7. During passing through the reaction pipe, sugar and polyols are converted into substances emitting fluorescence. Thus, the substances are cooled in a cooling tower 8 and the intensity of the fluorescence thereof is recorded in time series with a fluorescence detector 10 to determine sugar and polyols.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-62220

(43)公開日 平成8年(1996)3月8日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

G O I N 33/66  
33/533

識別記号

庁内整理番号

D

FI

### 技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 9 OL (全 8 頁)

(21)出願番号 特願平6-202185

(22)出願日 平成6年(1994)8月26日

(71)出題人 000001270

コニカ株式会社

東京都新宿区西新宿1丁目26番2号

(72)発明者 村上 隆

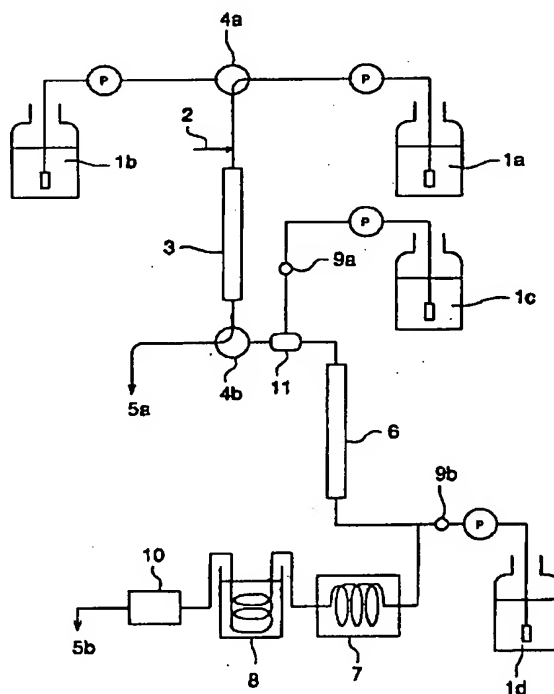
東京都日野市さくら町1番地コニカ株式会社  
社内

(54) 【発明の名称】 糖・ポリオール類の高感度測定方法及び測定装置

(57) 【要約】

【目的】 複雑な濃縮操作なしに高感度に糖・ポリオール類を測定する方法を提供する。また、高価な装置を用いることなく、簡便に糖・ポリオール類の高感度測定方法及び測定装置を提供する。

【構成】 被検体に含まれる糖・ポリオール類を、該糖・ポリオール類と親和性を有するカラムに吸着して濃縮し、次いで吸着した糖・ポリオール類を溶出させてから硼酸と接触させてアニオン性錯イオンを形成し、該糖・ポリオール類のアニオン性錯イオンは強アニオン交換カラムに対する吸着力の差により、測定目的の糖・ポリオール類と他の糖・ポリオール類に分離し、分離した糖・ポリオール類を蛍光物質に変化する試薬と反応させて、生じた蛍光物質を測定して液体試料中の微量の糖・ポリオール類を測定することを特徴とする糖・ポリオール類の高感度測定方法並びにその測定装置。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 被検体に含まれる糖・ポリオール類を、該糖・ポリオール類と親和性を有するカラムに吸着して濃縮し、次いで吸着した糖・ポリオール類を溶出させ、かつ硼酸と接触させてアニオン性錯イオンを形成し、該糖・ポリオール類のアニオン性錯イオンは強アニオン交換カラムに対する吸着力の差により、測定目的の糖・ポリオール類と他の糖・ポリオール類とに分離し、分離した糖・ポリオール類を蛍光物質に変化する試薬と反応させて、生じた蛍光物質を測定して液体試料中の微量の糖・ポリオール類を測定することを特徴とする糖・ポリオール類の高感度測定方法。

【請求項2】 前記糖・ポリオール類と親和性を有するカラムが $\alpha$ -アミノフェニルホウ酸を固定化したカラムであることを特徴とする請求項1記載の高感度測定方法。

【請求項3】 前記フェニルホウ酸カラムから糖・ポリオール類を溶出させる際の溶媒が0.1~1.0Mの硼酸を含む緩衝液であることを特徴とする請求項2記載の高感度測定方法。

【請求項4】 前記糖・ポリオール類を蛍光物質に変化させる試薬が過ヨウ素酸及びアルデヒドの存在下で蛍光物質に変化する試薬であることを特徴とする請求項1記載の高感度測定方法。

【請求項5】 前記アルデヒドの存在下で蛍光物質に変化する試薬がグアニジノ化合物であることを特徴とする請求項1記載の高感度測定方法。

【請求項6】 測定対象の糖・ポリオール類がD-カイトロイノシトールであることを特徴とする請求項1~5のいずれか1項に記載の高感度測定方法。

【請求項7】 被検体がイノシトール異性体を含むことを特徴とする請求項6記載のD-カイトロイノシトールの高感度測定方法。

【請求項8】 被検体に含まれる糖・ポリオール類を吸着する濃縮カラム、糖・ポリオール類の硼酸を含むアニオン性錯イオンを分離する強アニオン交換カラム、分離した糖・ポリオール類を過ヨウ素酸及びアルデヒドの存在下で蛍光物質に変化する試薬と反応させる反応槽、反応液を冷却する冷却槽及び生じた蛍光物質を測定する蛍光検出器から構成される糖・ポリオール類の測定装置。

【請求項9】 各被検体ごとに蛍光検出器で検出された蛍光のピーク面積の合計あるいはピーク高の合計を算出し、これが、あらかじめ確認された濃縮カラムの糖・ポリオール類の全結合容量に相当するピーク面積あるいはピーク高に対し一定以上を超えた場合に、警告を発する機能を有することを特徴とする請求項8記載の糖・ポリオール類の測定装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、糖・ポリオール類の高感度測定方法及び測定装置に関し、更に詳しくは、D-

カイトロイノシトールの高感度測定方法及び測定装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 近年、D-カイトロイノシトールが糖尿病の状態の診断に有用であるとの報告がなされている。特にII型糖尿病におけるインスリン抵抗性の指標になると考えられている (Larner J. et al, New Eng. J. Med., 323, 373-378(1990)等)。又、特開平4-505218号、特開平4-504001号では糖尿病の診断に体液(血液、尿)中のD-カイトロイノシトールの測定が有用であることが示されている。

【0003】 D-カイトロイノシトールの測定方法としてはこれまでにGC-Massによる測定方法が提案されているが、GC-Massによる測定は複雑な前処理が必要で、しかも操作が煩雑であるために、多数の検体を処理することが困難であるばかりでなく、自動化も難しく、さらに極めて高価なGC-Massの装置が必要であり、検査コストが著しく高くなるという問題があった。

【0004】 一方、液体クロマトグラフィによる糖類の測定については様々な報告がなされている。この中にはミオイノシトールを測定する方法も含まれるが、D-カイトロイノシトールを測定する方法は報告されていない。血液、尿、筋あるいは肝組織など生体試料中のD-カイトロイノシトールはミオイノシトールよりもその含有量が少ない。このため、D-カイトロイノシトールを測定するには、試料の濃縮操作が必要であることが判明した。例えば、健常者の尿中のD-カイトロイノシトール含有量は、1~数 $\mu\text{g/ml}$ である。また、健常者の1日の尿中D-カイトロイノシトール排出量が平均80 $\mu\text{mol/day}$ であり、II型糖尿病患者においては、平均約40 $\mu\text{mol/day}$ になるとの報告もなされている。従って、そのような試料の濃縮操作は煩雑であるばかりでなく、測定精度も悪化させるという問題があった。

【0005】 イノシトールなどのポリオール類はUV領域に吸収を持たないため、液体クロマトグラフィで通常良く用いられているUVによる検出方法は利用できない。そのため、下記の文献ではポストカラム発蛍光法による糖類測定が提案されている。Anal. Chem. 1980, 52, 1079-1082, J. liquid Chromatography, 14(10), 1929-1938 (1991), Analyst, 118, 769-771(1993)等。

【0006】 これらの方法は検出器に示差屈折計を用いた方法と比較すると感度は高くなっているが、微量の糖・ポリオール類を測定するにはまだ感度不足であった。特に、糖尿病の診断への有用性が報告されているミオイノシトール、D-カイトロイノシトール、ソルビトールなどは血液あるいは尿などの生体試料中の含有量も低く、濃縮操作なしに測定することは困難であった。特にD-カイトロイノシトールは尿中におよそ0.1~数 $\mu\text{g/ml}$ という極めて低い濃度しか含まれていない。この方法で測定する場合、100倍以上に濃縮する必要がある。しかしな

がら、このような濃縮は、濃縮のバラツキによって測定精度を低下させるばかりでなく、測定に無関係な成分も濃縮されるためこれらが測定を妨害するという問題があった。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、複雑な濃縮操作なしに高感度に糖・ポリオール類を測定する方法を提供することを目的としている。また、本発明は、高価な装置を用いることなく、簡便に糖・ポリオール類の高感度測定方法及び測定装置を提供することを目的とする。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】本発明の上記目的は以下の構成により達成される。

【0009】1) 被検体に含まれる糖・ポリオール類を、該糖・ポリオール類と親和性を有するカラムに吸着して濃縮し、次いで吸着した糖・ポリオール類を溶出させ、かつ硼酸と接触させてアニオン性錯イオンを形成し、該糖・ポリオール類のアニオン性錯イオンは強アニオン交換カラムに対する吸着力の差により、測定目的の糖・ポリオール類と他の糖・ポリオール類とに分離し、分離した糖・ポリオール類を蛍光物質に変化する試薬と反応させて、生じた蛍光物質を測定して液体試料中の微量の糖・ポリオール類を測定することを特徴とする糖・ポリオール類の高感度測定方法。

【0010】2) 前記糖・ポリオール類と親和性を有するカラムがm-アミノフェニルホウ酸を固定化したカラムであることを特徴とする前記1記載の測定方法。

【0011】3) 前記フェニルホウ酸カラムから糖・ポリオール類を溶出させる際の溶媒が0.1~1.0Mの硼酸を含有する緩衝液であることを特徴とする前記2記載の測定方法。

【0012】4) 前記糖・ポリオール類を蛍光物質に変化させる試薬が過ヨウ素酸及びアルデヒドの存在下で蛍光物質に変化する試薬であることを特徴とする前記1記載の測定方法。

【0013】5) 前記アルデヒドの存在下で蛍光物質に変化する試薬がグアニジノ化合物であることを特徴とする前記1記載の測定方法。

【0014】6) 測定対象の糖・ポリオール類がD-カイロイノシトールであることを特徴とする前記1~5のいずれか1項に記載の測定方法。

【0015】7) 被検体がイノシトール異性体を含むことを特徴とする前記6記載のD-カイロイノシトールの測定方法。

【0016】8) 被検体に含まれる糖・ポリオール類を吸着する濃縮カラム、糖・ポリオール類の硼酸を含むアニオン性錯イオンを分離する強アニオン交換カラム、分離した糖・ポリオール類を過ヨウ素酸及びアルデヒドの存在下で蛍光物質に変化する試薬と反応させる反応

槽、反応液を冷却する冷却槽及び生じた蛍光物質を測定する蛍光検出器から構成される糖・ポリオール類の測定装置。

【0017】9) 各被検体ごとに蛍光検出器で検出された蛍光のピーク面積の合計あるいはピーク高の合計を算出し、これが、あらかじめ確認された濃縮カラムの糖・ポリオール類の全結合容量に相当するピーク面積あるいはピーク高に対し一定以上を超えた場合に、警告を発する機能を有することを特徴とする前記8記載の糖・ポリオール類の測定装置。

【0018】本発明の、糖・ポリオール類の測定方法において、被検体は除蛋白されかつpHが7~9に維持されていることが好ましく、更に、該除蛋白方法が検体に水溶性亜鉛塩とアルカリ金属の水酸化物を加え、生成した沈殿物を除去する方法がより好ましい。

【0019】また、フェニルホウ酸カラムに糖・ポリオール類を吸着させ、かつ未吸着成分を排出する際の溶媒のpHが7~9であることが好ましい。

【0020】本発明の測定対象となる糖・ポリオール類としては、ミオイノシトール(MI)、D-カイロイノシトール(DCI)、Scyllo-イノシトールなどのイノシトールの異性体、ソルビトール、グルコース、ガラクトースなどの糖、糖アルコール、オリゴ糖、ポリオールでシスジオールを有するものが挙げられる。

【0021】本発明の糖・ポリオール類を吸着させるカラムは、被検体中の糖・ポリオール類を濃縮する役割がある。これらは、糖・ポリオール類に親和性を有するカラムであり、m-アミノフェニル硼酸を固定化したカラム(以下フェニル硼酸カラムとする)が好ましく用いられる。この方法は硼酸が弱アルカリ条件下で糖あるいはポリオール分子中のシス・ジオール基と可逆的な結合体を作ることを利用した方法である。本発明の濃縮用カラムとして用いられるフェニル硼酸カラムの糖・ポリオール類の結合容量は検出系の感度と被検体中に含まれるフェニル硼酸カラムに結合可能な糖・ポリオール類の全量とその中の測定対象の糖・ポリオール類の量比によって決定される。被検体中に測定対象の糖・ポリオール類のみが含まれる場合は、検出感度だけを考慮すればよいが、測定対象の糖・ポリオール類以外にその他の糖・ポリオール類が含まれる試料の場合は、その分フェニル硼酸カラムの結合容量を増加させる必要がある。一方で、フェニル硼酸カラム中の液体試料の容量が増え、次の分離工程に送られる試料の容量が増加するため、分離工程での隣接する糖・ポリオール類の分離が悪くなるなどの問題が生じる。例えば、ミオイノシトールとその異性体であるD-カイロイノシトールの分離が悪化するためフェニル硼酸カラムは必要最小限の容量であることが好ましい。市販のフェニル硼酸カラムへの糖・ポリオール類の結合容量はソルビトールの結合容量で示されており、本発明の測定方法では5  $\mu\text{mol}$ ~100  $\mu\text{mol}$ 好ましくは10

～40 $\mu$ molのソルビトールが結合できる容量のフェニル硼酸カラムを用いることが望ましい。

【0022】測定する際には、まず一定量の除蛋白された被検体をフェニル硼酸カラムへ供給し、糖・ポリオール類を吸着させる。濃縮カラムに糖類の結合容量以上の糖・ポリオール類が供給されると結合できない糖・ポリオール類は排出されてしまい正確な測定ができなくなる。そのため、本測定装置には、許容量以上の糖・ポリオール類が供給された場合に警告を発する機能があることが好ましい。すなわち、あらかじめ確認しておいた濃縮カラムの糖・ポリオール類の結合可能容量に相当するピーク面積又はピーク高に対し、各測定ごとに蛍光検出器で検出された蛍光の全ピーク面積の合計あるいは全ピーク高の合計を算出し、これが一定以上を超えた場合には、濃縮カラムの糖・ポリオール類の結合可能容量以上の試料がカラムに供給されたとの警告を発する機能を有することが好ましく、もし結合可能容量以上の試料がカラムに供給された場合は、試料量を減らすか、カラム容量を増やすなどの調整をすることによって糖・ポリオール類の正確な測定を行なうことができるのである。

【0023】糖・ポリオール類を濃縮カラムに吸着させる際は、被検体及びその吸着液は、pH 7～9が好ましく、pH 8～8.5であることがより好ましい。硼酸を含まなければ緩衝剤としては特に限定されないが、10～50mM HEPES-NaOH pH 8～8.5、10～100mM トリス-HCl pH 8～8.5、10～100mM リン酸緩衝液などが好ましい。この濃縮カラムに吸着しない成分は次の分離用カラムとの間に設けられた切り替えバルブによって測定系外に排出される。次に吸着した被検体中の糖・ポリオール類は前記のバルブを切り替えて分離用カラムに送られる。その際の溶出液は0.1～1.0Mの硼酸を含有することが好ましい。又、溶出液のpHは5～6であることが望ましい。溶出した糖・ポリオール類は溶出液又は溶離液中の硼酸とアニオン性錯イオンを形成する。これを分離用の強アニオン交換カラムで分離する。

【0024】分離用の強アニオン交換カラムとしては市販されているカラムを利用することができ、TSK gel Sugar AXG(東ソー株製)などが好ましく用いられる。

【0025】強アニオン交換カラムは60～80℃の一定の温度に保たれていることが好ましい。温度が高いほど隣接ピークの分離能が向上する。強アニオン交換カラムの溶離液は0.6～1.0M 硼酸緩衝液 が用いられ、pH 7.0～8.5の範囲が好ましく用いられる。又、強アニオン交換カラムの流速は0.2～0.4ml/minの範囲が好ましい。

【0026】強アニオン交換カラムで分離された試料は反応液と混合され反応槽内で加熱されて蛍光物質に変化する。この反応液には過ヨウ素酸及びアルデヒドと反応して蛍光を発する試薬が好ましく用いられる。これはカラムによって分離された試料と反応液と混合し、リアクタ内で加熱し反応させて糖・ポリオール類の存在によ

て生じる蛍光のピークを検出する方法である。アルデヒドと反応して蛍光を発する試薬としては、塩酸グアニジン、酢酸グアニジンなどのグアニジノ化合物、2-シアノアセトアミドなどが用いられ、特に塩酸グアニジン、酢酸グアニジンなどのグアニジノ化合物が好ましく用いられる。これらの試薬は、反応液に含まれる過ヨウ素酸と糖・ポリオール類との反応によって生じたアルデヒドと反応し蛍光物質に変化する。

【0027】発色液にこれらの化合物を含有させる場合、反応液中の塩酸グアニジンは好ましくは25～100mM、酢酸グアニジンは10～30mMが好ましい。又、酢酸グアニジンは溶解しにくいので、一度、反応液に含有させる緩衝液の酸性成分を添加し、酸性条件下で酢酸グアニジンを添加溶解させて、その後目的のpHに調整するとよい。反応液の緩衝剤としてはリン酸、硼酸などが好ましく用いられる。発色液のpHは6～9が好ましい。

【0028】又、測定対象がポリオール類である場合は発色液中に過ヨウ素酸を含有させる必要がある。この場合、過ヨウ素酸は1～20mMの濃度で含有していることが好ましい。過ヨウ素酸はナトリウム塩などが好ましく用いられる。

【0029】発色液と混合された試料は反応槽内で加熱反応させて蛍光物質に変えられる。反応槽内部の反応管は、直径0.5～1.2mm×長さ10～20mのステンレスチューブをコイル状にしたものが好ましい。テフロン製の反応管ではノイズが多く、S/N比を低下させてしまうので好ましくない。又、反応槽温度は130℃～160℃であることが好ましく、特に150℃が好ましい。

【0030】反応槽の後に接続される冷却槽には、直径0.2～0.6mm×長さ3～10mのステンレスチューブが用いられ、この冷却管は反応管よりも細い管を用いることが特に重要である。特に直径0.25mm×長さ5mの冷却管が好ましい。これを、氷水等の冷媒中に保持する。これによって、反応槽内で加熱された反応液と分離用カラムの溶出液との混合液からのエアの発生が抑制され、ノイズを低下させ、感度を上げることができる。

【0031】検出には蛍光検出器を用いる。例えば、反応液に酢酸グアニジンを用いる場合は、励起波長(Ex) 370nm、蛍光波長(Em) 455nm、塩酸グアニジンを用いる場合は、Ex 325nm, Em 400nm、あるいはEx 314nm, Em 433nmなどで測定される。

【0032】本発明において試料は前処理される。即ち、糖類に親和性のあるカラム(濃縮カラム)には、糖化蛋白質・糖蛋白なども結合することができる。これらの蛋白質が分離工程へ送られると、分離カラムの劣化を早めるだけでなく、これらの蛋白質が結合する分、濃縮カラムの糖類の結合容量を増やす必要がある。しかしながら濃縮カラムの容量を増やすと、分離工程へ送られる試料容量が増加し次のイオン交換カラムでの分離が不十分になるという問題が生じる。従って、測定対象の被検

体はできるだけ除蛋白されたものであることが望ましい。

【0033】除蛋白の方法は、あらかじめ試料をSephadex G-25などのゲル濾過カラムで処理してもよいし、フェニル硼酸カラムの前にゲル濾過のカラムを接続し、UV検出器で蛋白質の280nmの吸光度をモニターして高分子画分を排出した後、流路を切り替えてフェニル硼酸カラムに導いてもよい。この場合、ゲル濾過の際の溶離液はpH7.5~9.5であることが好ましい。

【0034】あるいは、限外濾過や透析という方法で高分子画分だけを取り出して測定に用いることも可能である。しかしながら、これらの方法は作業が煩雑でかつ時間がかかるため、多量の検体を同時に処理することは困難である。

【0035】一方、除蛋白の方法として、過塩素酸やトリクロロ酢酸を用いる方法が知られているが、これらは除蛋白後の上清が強酸性を示すため、中和操作が必要であり、又、中和後もこれらの塩濃度が高く、濃縮カラムへ試料を吸着させる上で好ましくない。そこで、除蛋白方法について検討した結果、水溶性亜鉛塩とアルカリ金属による除蛋白方法が、除蛋白後のpH調整が不要で、測定を妨害する不要な塩を含まず、多数の検体を比較的短時間で処理することができ、さらに糖・ポリオール類の測定感度も高く、本発明の測定方法に用いることが特に好ましいことがわかった。

【0036】水溶性亜鉛塩とアルカリ金属による除蛋白については特開平6-109726号などに記載されているように、被検体に水溶性亜鉛塩とアルカリ金属水酸化物を加え、室温下でミキサー等を用いてよく混和し、3000~5000rpmにて10分間程度遠心分離して、沈殿物を除去する。このようにして得られた上澄み液は、無色透明であり、かつ、被検体に含まれていた、糖・ポリオール類は殆ど失われることなく、上記上澄み液に回収される。

【0037】即ち、本発明は、糖・ポリオール分子中のシス・ジオール基を利用して濃縮用カラムに吸着させ、検体中の測定感度以下の糖・ポリオール類を濃縮し、次にこれらを脱着させて分離用カラムに導くことによって、特別な濃縮操作なしに被検体中の微量の糖・ポリオール類を測定することが可能となった。

【0038】次に本発明で用いられる測定装置について、図面を参照して説明する。図1において、吸着液は1aのボトルに、溶出液は1bのボトルに、それぞれ入れる。それぞれの液は、圧力ポンプPと、切り替えバルブ4aを通り、濃縮用カラム3と連結する。測定に先立ち、切り替えバルブ4aを吸着液側に切り替え、切り替えバルブ4bは排出口5a側にして、吸着液側の圧力ポンプを稼働させ、まず濃縮用カラムを洗滌する。次いでサンプル圧入口2から除蛋白したサンプルを圧入し、しばらく、このまま吸着液を流し続け、糖・ポリオール類以外の妨害物質を5aから排出する。妨害物質を排出し

た後、切り替えバルブ4aを溶出液側に、切り替えバルブ4bはアニオン交換カラム6側に変え、溶出液側の圧力ポンプを稼働して、溶出液を濃縮用カラムに流す。これにより、濃縮用カラムに吸着している、糖・ポリオール類は、カラムから溶出する。溶出した糖・ポリオール類は4bを通り、ミキサー11に送られる。1cのボトルに入れてある溶離液は、経路にある圧力ポンプPで送液される。逆止弁9aは、1c側からの液のみを通す。前述した糖・ポリオール類と溶離液はミキサー11内で混合されアニオン交換カラム6に送液される。溶離液と溶出液の混合比は任意であるがアニオン交換カラムに送液される混合液は0.5~1.0Mの硼酸を含有し、pHは7~9であることが好ましい。そのため、混合液が上記条件内にあれば、測定の間、溶出液と溶離液と一定流量で送液することができる。一方、アニオン交換カラムで分離された糖・ポリオール類溶出ピークは、溶離液中の硼酸濃度が高い程、溶出時間が短縮され、ピークも鋭くなり検出感度が高くなる。そのため、濃縮用カラムに吸着していた糖・ポリオール類が溶出されミキサーを通過した段階で溶出液の送液を停止し、1cの溶離液のみを送液した方が好ましい。この時、溶出液の送液量をいきなりゼロにすることも可能であるが、より好ましくは、徐々に送液量を少なくすることが望ましい。其の際、溶出液と溶離液の送液量の和が変動しないように溶出液の送液量減少分、溶離液の送液量を増加させることが、アニオン交換カラムで糖・ポリオール類を分離する上で好ましい。溶離液又は溶出液との混合液により、アニオン交換カラムに送液された糖・ポリオール類は、その吸着力の差により、時系列的に溶離してくるので、1dに入れてある反応液を、経路にある圧力ポンプPを稼働させて流し、溶離液と混合して反応槽7にセットされている反応管へ流す。反応液の経路にある逆止弁9bは、上述した9aと同じ働きをする。反応管を通る間に、糖・ポリオール類は蛍光を発する物質になり、冷却槽8にセットされている冷却管を通して冷やされ、蛍光検出器10に導かれる。蛍光検出器により、時系列的に蛍光の強さが記録され、糖・ポリオール類が定量できる。

【0039】図2は、図1の濃縮用カラム系の装置がなく、後半のアニオン交換カラム以降がセットされた装置の模式図であり、機能は図1の後半部分と同じである。

【0040】

【実施例】

実施例1

図1で示される構成の測定装置を組み立て、本発明の測定装置とし、図2で示される構成の測定装置を組み立て、これを比較の測定装置とした。詳細な測定条件は表1に示す。

【0041】検体の前処理

1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DCIを含む7% HSA・PBS 2mlに室温下で水10mlを加え、更に84mg/mlの硫酸亜鉛水溶液 2ml及

10

20

30

40

50

び0.6N NaOH 2.8mlを加えよく混合し、5000rpmにて10分間遠心分離し、上澄み8.4mlを分取した。これを本発明の試料前処理-1とする。

【0042】1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DCIを含む7% HSA・PBS 2mlに対し、30%トリクロル酢酸1mlを添加し、遠心分離し上澄み1.5mlを分取した。これにNaOHを添加しpH8.5に調整した。これを比較の前処理-1とする。

\*

\*【0043】1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DCIを含む7% HSA・PBS 1mlをセファデックスG-25( $\phi 10 \times 300\text{mm}$ )でゲル濾過し、低分子画分を分取した。溶媒には20mM HEPES-NaOH pH8.5を用いた。これを比較の前処理-2とする。

【0044】

【表1】

	本発明の測定装置	比較の測定装置
7x10 <sup>4</sup> 硼酸カラム	4.6mm I.D. $\times$ 30mm TSK gel Boronate-5PW (東ソー製)	—
7x10 <sup>4</sup> 硼酸カラム温度	室温	—
吸着液	20mM HEPES-NaOH pH8.5, 0.2ml/min	—
溶出液	0.1M 硼酸緩衝液 pH6.0 0.2ml/min	—
強7x10 <sup>4</sup> 交換カラム	TSK gel sugar AXG 4.6mm I.D. $\times$ 150mm (東ソー製)	
カラム温度	70°C	
溶離液	0.8M 硼酸緩衝液 pH8.5, 0.2ml/min	
反応液	4mM 過ヨウ素酸Na, 50mM 塩酸7x10 <sup>4</sup> , 0.1% リン酸 (NaOHにてpH6.5に調整), 0.2ml/min	
反応管(ステンレス製)	$\phi 0.6\text{mm} \times 20\text{m}$	
リアクタ温度	150°C	
冷却管(ステンレス製)	$\phi 0.25\text{mm} \times 5\text{m}$	
冷却槽温度	0°C(氷水)	
蛍光検出器	Em: 325nm, Ex: 400nm	

【0045】本発明の測定装置を用いて、本発明の試料前処理-1及び比較の試料前処理-1, 2にて処理した被検体を各々前処理前のサンプル1mlに相当する量を用いて測定した。(前処理はn=3で行なった。)その結果※

※を表2に示す。

【0046】

【表2】

検体	前処理方法	HPLC E-7高さ (mV)		
		1	2	3
1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DCI 7% HSA・PBS	本発明の前処理-1	1.8	1.8	1.8
	比較の前処理-1	1.4	1.3	1.4
	比較の前処理-2	1.4	1.7	1.6

【0047】このように本発明の前処理-1は比較の前処理-1と比較してピークが高くなった。さらに比較の前処理-1は中和操作が必要であり、操作が煩雑であった。又、比較の前処理-2は前処理での誤差が非常に大きく、又1つ1つのサンプルの処理に時間を要した。これに対し、本発明の前処理-1は簡便で正確な試料の前処理が短時間で可能であり、感度も高く、最も好ましい

前処理方法であった。

【0048】実施例2

DCI及びMIを0.1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ で含有する0.1M HEPES-NaOH pH8.5を検体として、実施例1の方法に準じて測定し、DCI及びMIの最低検出感度を比較した。

【0049】

【表3】



装置	サンプル濃度 0.1N HEPES- NaOH pH8.5	HPLCに 用いた サンプル量	結果
本発明の測定装置	DCI 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MI 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1ml	DCIとMIが分離され、ピークが確認できた
本発明の測定装置	DCI 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MI 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10ml	DCIとMIが分離され、ピークが確認できた
比較の測定装置	DCI 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MI 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{l}$	DCIとMIが分離され、ピークが確認できた
比較の測定装置	DCI 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MI 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 $\mu\text{l}$	DCIとMIのピークは検出できなかった
比較の測定装置	DCI 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MI 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1ml	DCIとMIのピークが分離されず、ピークはブロードとなった

【0050】 その結果、表3に示したように比較の測定装置ではDCIとMIが100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ではDCIとMIが分離され、ピークが確認できたが、DCIとMIが1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ではピークは検出できなかった。これに対し、本発明の測定装置ではサンプル量を増やすことによって、DCIとMIが0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで検出することが可能であった。従って、本発明の方法が低濃度の糖・ポリオール類の測定に優れていることがわかる。

#### 【0051】 実施例3

標準試料としてDCI 0.1~10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びMI 0.1~10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含む0.1% HSA・PBSを本発明の前処理-1の方法で除蛋白し、標準試料1mlに相当する量を実施例1に示した本発明の測定装置を用いて測定し、検量線を作成した。同様に健常人の尿試料(検体1~5)を本発明の前処理-1の方法で除蛋白し、尿試料1mlに相当する量を本発明の測定装置を用いて実施例1に準じてDCI及びMIを測定した。その結果、表4に示した検量線が得られ、表5に示した通り尿中DCI及びMIが測定することが確認された。

#### 【0052】

##### 【表4】

Standard	DCI	MI
0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0.2 mV	0.2 mV
0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.0 mV	0.9 mV
1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.8 mV	1.7 mV
5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8.8 mV	8.9 mV
10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	17.5 mV	17.0 mV

#### 【0053】

##### 【表5】

	DCI ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MI ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
検体1	0.5	0.7
検体2	1.2	2.1
検体3	3.2	3.7
検体4	1.8	2.2
検体5	0.9	1.5

#### 【0054】

【発明の効果】 本発明により、複雑な濃縮操作なしに高感度に糖・ポリオール類を測定する方法を提供することができる。また、本発明は、高価な装置を用いることなく、簡便な糖・ポリオール類の高感度測定方法及び測定装置を提供できた。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の測定装置を示す模式図である。

【図2】 比較用の測定装置を示す模式図である。

#### 【符号の説明】

- 1 a 吸着液用ボトル
- 1 b 溶出液用ボトル
- 1 c 溶離液用ボトル
- 1 d 反応液用ボトル
- 2 サンプル圧入口
- 3 濃縮用カラム
- 4 a 切り替えバルブ
- 4 b 切り替えバルブ
- 5 a 排出口
- 5 b 排出口
- 6 アニオン交換カラム
- 7 反応槽
- 8 冷却槽
- 9 a 逆止弁
- 9 b 逆止弁

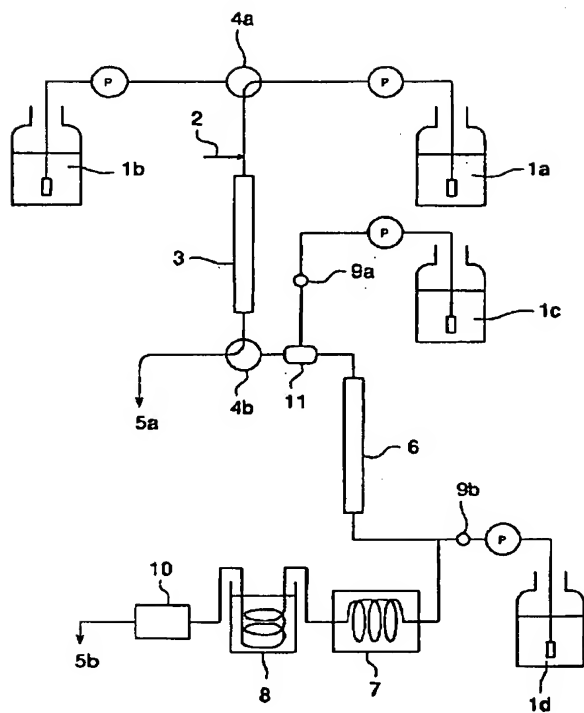
\* P. 圧力ポンプ

\*

10 蛍光検出器

11 ミキサー

【図1】



【図2】

